

90-311416/41 B04 D16 E23
 LENINGRAD LENS OVET TECH
 20.11.87-SU-331426 (23.12.89) C07d-235/20 C09k-11/06
 New fluorescent dye for DNA studies - comprises phenyl-
 benzimidazolyl-N-di:methylamino propyl-benzimidazole-
 carboxamide tri:hydrochloride
 C90-134904

LENI 20.11.87

*SU 1530-628-A

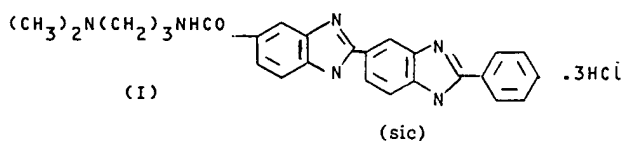
B(4-B4A1, 6-D5, 11-C7B3, 12-K4A) D(5-H9) E(6-D5) N(6-C)

New 2-(2-phenyl-5 (6)- benzimidazolyl)- N-(3-dimethylamino propyl)-5(6)- benzimidazole carboxamide trihydrochloride has formula (I).

(I) is obtd. by hydrogenation of 3-nitro-4-amino-N-(3-dimethylamino propyl) benzamide in the presence of Ni-Raney catalyst, at room temp., in methanol medium, followed by treatment of prod. with the hydrochloride of methoxyethyl iminoether of 2-phenyl-5(6)-benzimidazole carboxylic acid; with boiling for 5 hrs.

The yield of (I) is 68%, m.pt. above 350 deg. C, and irradiation range within 350-450 nm at max. 387 nm. The intensity of fluorescence of cells coloured with the proposed dye (I) is in direct proportion to their DNA content. The emission band of (I) does not interfere with other fluorescence bands and the quantum yield is increased, compared to other known dyes of similar type.

USE/ADVANTAGE - New cpd. (I) can be used in biology as a dye for DNA fluorimetry. New dye (I) has increased efficiency. Bul.47/23.12.89 (4pp Dwg.No. 0/0)





СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1530628** **A 1**

(SD) 4 C 07 D 235/20, C 09 K 11/06

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

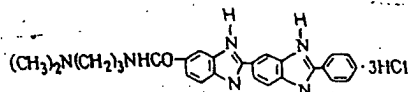
(21) 4331426/31-04
(22) 20.11.87
(46) 23.12.89. Бюл. № 47
(71) Ленинградский технологический институт им. Ленсовета
(72) И.В.Склярова, А.В.Гарабаджиу, О.Ф.Гинзбург, Ю.М.Розанов и В.Н.Умецкая
(53) 547.785.5 (088.8)
(56) Latt S.A., Wohleb S.Chromosoma, 1975, v.52, p. 297-316.

(54) ТРИГИДРОХЛОРИД 2-[2-ФЕНИЛ-5(6)-БЕНЗИМИДАЗОЛИЛ]-N-(3-ДИМЕТИЛАМИНОПРОПИЛ)-5(6)-БЕНЗИМИДАЗОЛКАРБОКСАМИДА В КАЧЕСТВЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ДНК

(57) Изобретение относится к производным бис-бензимидазолов, в частности к тригидрохлориду 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида, который может быть использован в качестве флуоресцентного красителя для

исследования ДНК в биологии. Цель изобретения - создание более эффективных красителей указанного класса. Синтез целевого соединения ведут гидрированием 3-нитро-4-амино-N-(3-диметиламинопропил)бензамида в присутствии Ni Ренея при комнатной температуре в среде метанола с последующей обработкой гидрохлоридом-метоксиэтилового иминоэфира 2-фенил-5(6)-бензимидазолкарбоновой кислоты при кипячении (5 ч). Выход 68%, т.пл. >350°C, брутто-формула $C_{26}H_{26}N_6O \cdot 3HCl$, область излучения находится в пределах 350-450 нм при $\lambda_{max} \approx 387$ нм. Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных этим красителем, пропорциональна содержанию в них ДНК, причем в отличие от известных ДНК-тропных флуоресцентных зондов, это вещество имеет структурированную эмиссионную полосу, не перекрывающуюся другими флуоресцентными метками, и более высокий квантовый выход. 2 ил., 1 табл.

Изобретение относится к органической химии, а именно к новому тригидрохлориду 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида формулы



который может найти применение в качестве красителя в методе ДНК-флуориметрии.

Цель изобретения - создание нового ДНК-тропного зонда в ряду бис-бензимидазолов, обладающего структурированным спектром флуоресценции, расширяющего спектральные возможности метода ДНК-флуориметрии.

На фиг.1 приведены спектры флуоресценции препарата (I) и "Хехста-33258 в фосфатном буфере (М 0,05) при pH 6,8); на фиг.2 - гистограммы распределения окрашенных клеток тимуса мыши по интенсивности флуоресценции.

(19) **SU** (11) **1530628** **A 1**

Пример 1. Тригидрохлорид 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида.

Раствор 0,4 г (1,5 ммоль) 3-нитро-4-амино-N-(3-диметиламинопропил)бензамида в 30 мл метанола гидрируют при комнатной температуре и нормальном давлении в присутствии Ni Ренея (10 мас.%). После поглощения расчетного количества водорода раствор отфильтровывают в атмосфере аргона, упаривают метанол в вакууме, остаток растворяют в 30 мл ледяной уксусной кислоты. К полученному раствору добавляют 0,581 г (1,58 ммоль) гидрохлорида метоксиэтилового иминоэфира 2-фенил-5(6)-бензимидазолкарбоновой кислоты. Реакционную смесь кипятят 5 ч. Уксусную кислоту отгоняют в вакууме. Маслянистый остаток затирают до образования кристаллов в 30 мл 7 н. раствора хлористого водорода в изопропиловом спирте. Осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Выход 0,558 г (68%). Т.пл. 350°C.

Найдено, %: С 56,84; Н 5,21; N 15,25; Cl 19,50. $M^+ = 438$ (масс-спектрально, в виде основания)

$C_{26}H_{26}N_6O \cdot 3HCl$

Вычислено, %: С 56,99; Н 5,33; N 15,34; Cl 19,41. $M = 438,5$.

Основная область излучения полученного препарата (I) лежит в пределах 350-450 нм, $\lambda_{max} \approx 387$ нм.

Краситель "Хехст 33258" обладает следующими спектральными характеристиками: $\lambda_{max} \approx 465$ нм в основной области излучения 410-530 нм (фиг.1).

Пример 2. Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных препаратом (I) или Хехст-33258, пропорциональна содержанию в них ДНК. Гистограммы распределения окрашенных клеток тимуса мыши по интенсивности флуоресценции (фиг.2) идентичны для сравниваемых красителей.

Результаты определения долей клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла (G_0+G_1 , S и G_2+M), полученные при обработке 10 гистограмм для каждого красителя, даны в таблице.

Коэффициенты вариации пиков G_0+G_1 гистограмм невелики, что свидетельствует о высокой стабильности и надежности окрашивания. Таким образом, аналогично красителю Хехст-33258

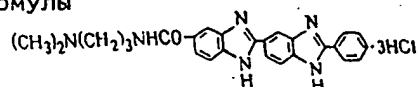
препарат (I) может использоваться для количественной ДНК-цитометрии.

Предлагаемый препарат (I) обладает ярко выраженной нуклеотидной специфичностью. Результаты оценки относительной доли АТ-пар в геноме двух животных (ящерицы и мыши), проведенной с помощью сравниваемых красителей, практически одинаковы. Таким образом, препарат (I) обладает нуклеотидной специфичностью АТ-типа.

Характеристики	Показатели для препарата	
	Хехст-33258	(I)
Параметры ДНК-гистограммы:		
доля G_0+ ;		
$+G_1$, %	89,6 \pm 0,6	90,2 \pm 0,5
доля S, %	5,3 \pm 0,3	5,0 \pm 0,4
доля G_2+M , %	5,1 \pm 0,3	4,8 \pm 0,2
Коэффициент вариации пика G_0+G_1	2,5 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2
Относительная доля АТ-пар в геноме ящерицы по сравнению с геномом мыши	0,793 \pm 0,015	0,774 \pm 0,016
$\frac{АТя/(АТ+ГЦ)я}{АТм/(АТ+ГЦ)м}$		

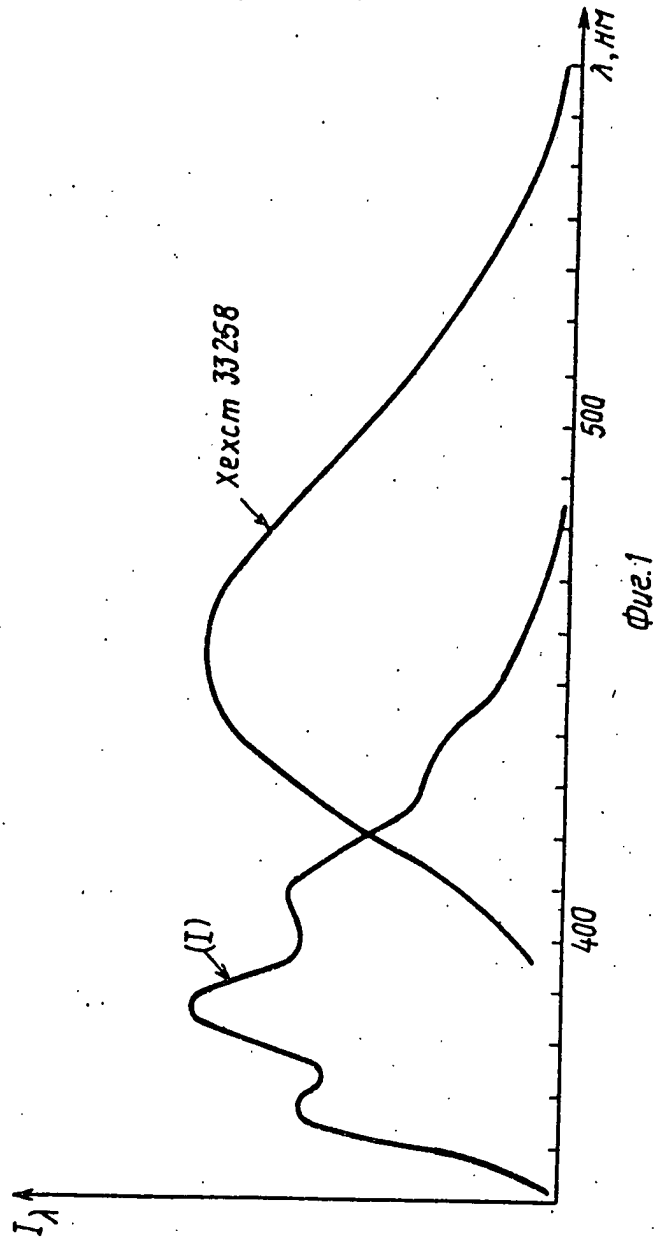
Предлагаемый препарат - тригидрохлорид 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида отличается от известных ДНК-тропных флуоресцентных зондов тем, что имеет структурированную эмиссионную полосу, не перекрывающуюся с аналогичными полосами известных флуоресцентных меток, и более высокий квантовый выход, что расширяет возможности многопараметрического анализа в клеточной биологии и биотехнологии.

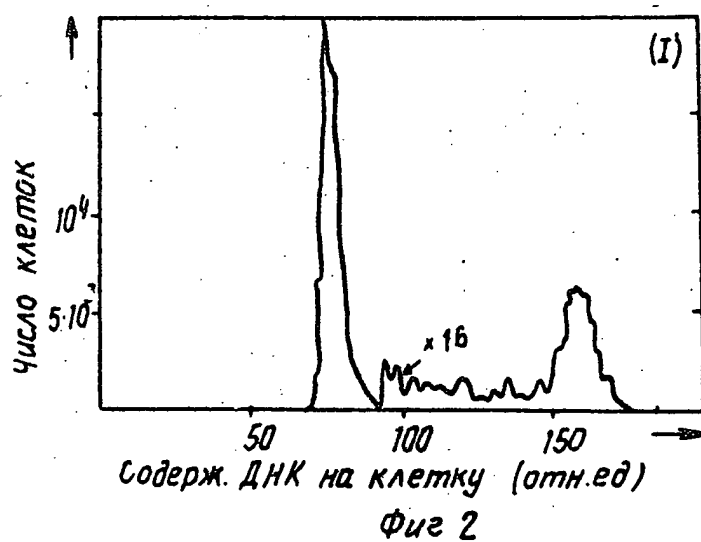
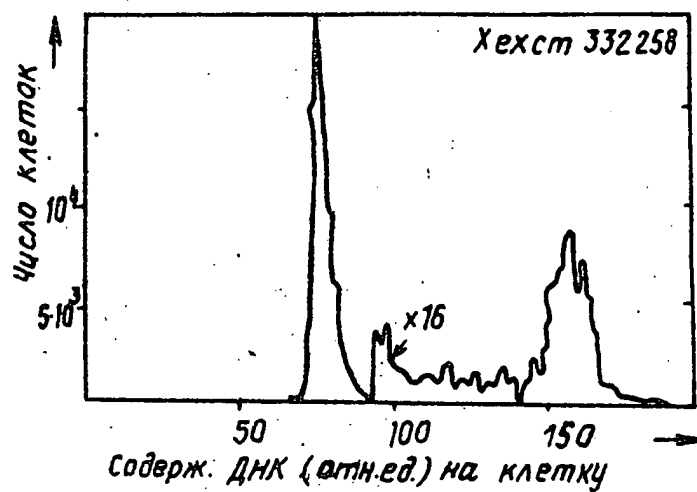
Формула изобретения
Тригидрохлорид 2-[2-фенил-5(6)-бензимидазолил]-N-(3-диметиламинопропил)-5(6)-бензимидазолкарбоксамида формулы



в качестве флуоресцентного красителя для исследования ДНК.

1530628





Составитель Г. Жукова

Редактор Н. Гулько Техред М. Дидык

Корректор М. Кучерявая

Заказ 7862/27

Тираж 352

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101